

(19) Japan Patent Office (JP)

(11) Published Unexamined Patent Application No.

(12) Published Unexamined Patent Application (A)

H5-312761

(43) Provisional Publication Date: November 22, 1993

(51) Int. Cl. ⁵	ID Code	JPO File No.	FI	Technical Indication
----------------------------	---------	--------------	----	----------------------

G01N 27/327

27/28	381	Z	7235-2J	
-------	-----	---	---------	--

7235-2J

G01N 27/30 353 J

7235-2J

353 Z

Request for Examination: Not yet made

Number of Claims: 2

Total Pages: 6

(21) Patent Application No.: H4-146336

(22) Filing Date: May 12, 1992

(71) Applicant: 000010087

Toto Kiki Ltd.

2-1-1 Nakashima, Kokura-Kita-ku, Kita-Kyushu-shi, Fukuoka Prefecture

(72) Inventor: Yukihiro Fukuda

2-1-1 Nakashima, Kokura-Kita-ku, Kita-Kyushu-shi, Fukuoka Prefecture

c/o Toto Kiki Ltd.

(72) Inventor: Hiroyuki Tsuboi

2-1-1 Nakashima, Kokura-Kita-ku, Kita-Kyushu-shi, Fukuoka Prefecture

c/o Toto Kiki Ltd.

(72) Inventor: Toshio Oguro

2-1-1 Nakashima, Kokura-Kita-ku, Kita-Kyushu-shi, Fukuoka Prefecture

c/o Toto Kiki Ltd.

(74) Agent: Takao Igarashi, Patent Attorney (and 1 other)

(54) Title of the Invention: A Biosensor and a Method of its Production

(57) Abstract

[Purpose] The purpose of the present invention is to provide a biosensor and its production process that makes it possible to measure a target substance in a solution within a short response time.

[Constitution] An identification layer 7 holding a biosubstance can be formed in a fixed thickness with a wide area and little unevenness, because it is formed by accumulating in a partitioned space at the bottom of a measuring chamber 21. Since the unevenness of the thickness of the identification layer 7 can be reduced, it is possible to form a working electrode 5 and an opposite electrode 15 at a small interval by inserting an insulating layer 11 in between the working electrode 5 and the opposite electrode 15, maintaining a fixed interval between them and avoiding contacting the identification layer 7 with the opposite electrode 15. As a result, we can shorten an electric line of the electric double formed between

working electrode 5 and the opposite electrode 15. Accordingly, it is possible to converge noise current within a short period that flows at the beginning of the measurement, which leads to shortening a measuring time of a target substance.

Claims:

1. A biosensor used to measure a target substance by measuring an electric variation caused by biochemical reaction between the target substance in a solution and a biosubstance, wherein said biosensor comprises an insulating substrate; an working electrode laminated on the insulating substrate; an identification layer holding said biosubstance and laminated on said working electrode; an insulating layer laminated on said insulating substrate (except for the identification layer); an opposite electrode laminated on the insulating layer to be used to measure an electric variation between the opposite electrode and said working electrode; and a measuring chamber formed in such a way that part of said insulating layer is removed so that said target solution can be stored and said identification layer and said opposite electrode can be immersed in the stored target solution.
2. A method of producing a biosensor used for measuring a target substance by measuring an electric variation caused by biochemical reaction between the target substance in a solution and a biosubstance, wherein said method comprises a process to form an insulating substrate; a process to accumulate a working electrode on the insulating substrate; a process to form an insulating layer on the insulating substrate and the working electrode; a process to form an opposite electrode on the insulating layer in order to measure an electric variation between the opposite electrode and said working electrode; a process to form a measuring chamber by removing part of the insulating layer in such a way that said target solution can be stored and the working electrode can be exposed; and a process to accumulate an identification layer holding a biosubstance on the working electrode exposed in the measuring chamber.

Detailed Explanation of the Invention:

[0001]

[Industrial Field of Application] The present invention relates to a biosensor and its production method used for measuring a target substance in a solution by measuring an electric variation caused by biochemical reaction between the target substance and a biosubstance

[0002]

[Prior Art] As this type of biosensor, for example, a plate-type biosensor is well known as shown in published unexamined patent application No. S61-50262. As shown in figure 4, a plate-type biosensor 100 comprises a ceramic substrate 101, a working electrode 103 and an opposite electrode 105 formed on the ceramic substrate 101, an insulating layer 108 to insulate the interval between said working electrode 103 and opposite electrode 105, an identification layer 107 formed by applying gel material holding such a biosubstance as enzyme to said working electrode 103, and an electric measuring section (not shown in the figure) connected to the terminals 105 and 109 of said working electrode 103 and opposite electrode 105 respectively for the measurement of current values between them, where a sensitivity station 113 is on the side of said identification layer 107.

[0003] A solution can be measured using this biosensor 100 by immersing the sensitivity station 113 in

the solution. A biosubstance held on the identification layer 107 biochemically reacts with a target substance contained in the solution and generates oxygen or hydrogen peroxide. The target substance can be measured by measuring current generated by the redox reaction of such oxygen or hydrogen peroxide.

[0004]

[Problems that the Invention is to Solve] It is important to measure a target solution in as short a time as possible using such a biosensor 100. It is, however, difficult to measure a target substance in a short period using a traditional biosensor for the reasons as shown below. Figure 5 shows the relationship between current values and time when the above-said biosensor is used for measurement. In figure 5, the broken line, the alternate long and short dash line, and the continuous line show an initial current value A, an observed current value B, and a measured current value C, respectively.

[0005] The initial current value A was observed when the working electrode 103 and the opposite electrode 105 were immersed in a buffer solution with no target substance contained. When the working electrode 103 and the opposite electrode 105, which are dry, are immersed in a buffer solution, an electric double is formed. The initial current flows in such a way as to eliminate the electric double. Time t_1 needed for converging the initial current is proportional to the interval between the working electrode 103 and the opposite electrode 105. The observed current value B starts at the converged state of the initial current value A and flows triggered by biochemical reaction between a target substance and a biosubstance when the target substance is added to a buffer solution. In other words, the observed current value B is based on only biochemical reaction and converges to a fixed value when the reaction reaches saturation. The measured current value C is the sum value of the initial current value A and the observed current value B obtained by immersing the sensitivity station 113 of the biosensor in a target solution prepared by dissolving a target substance in a buffer solution.

[0006] To measure, for example, glucose in urine using said biosensor 100, said measured current value C must be used. The measured current value C includes the initial current value A and is measured only after the initial current value A converges. In other words, the measured current value C is not measurable when the initial current value A is large (time t_0 to time t_1). It is possible to reduce t_1 , time necessary for the initial current value A to converge, by shortening an electric line of the electric double formed between the working electrode 103 and the opposite electrode 105. Reducing the interval between the working electrode 103 and the opposite electrode leads to shortening an electric line of the electric double.

[0007] The identification layer 107 is formed on the abovementioned plate-type biosensor 100 by applying a sol substance holding a biosubstance to the working electrode 103. If the interval between the working electrode 103 and the opposite electrode 105 is reduced, the sol substance is applied not only to the working electrode 103 but also to the opposite electrode 105 to form the identification layer 107; and therefore current value is not measurable.

[0008] The present invention is to solve the problems originated from the above-said prior art by providing a biosensor and its production process that makes it possible to measure a target substance in a solution within a short response time.

[0009]

[Means of Solving the Problems] The present invention according to claim 1 as a means of solving the above-said problems relates to a biosensor used to measure a target substance by measuring an electric variation caused by biochemical reaction between the target substance in a solution and a biosubstance, where said biosensor comprises an insulating substrate; an working electrode laminated on the insulating substrate; an identification layer holding said biosubstance and laminated on said working electrode; an insulating layer laminated on said insulating substrate (except for the identification layer); an opposite electrode laminated on the insulating layer to be used to measure an electric variation between the opposite electrode and said working electrode; and a measuring chamber formed in such a way that part of said insulating layer is removed so that said target solution can be stored and said identification layer and said opposite electrode can be immersed in the stored target solution.

[0010] The present invention according to claim 2 relates to a method of producing a biosensor used for measuring a target substance by measuring an electric variation caused by biochemical reaction between the target substance in a solution and a biosubstance, where said method comprises a process to form an insulating substrate; a process to accumulate a working electrode on the insulating substrate; a process to form an insulating layer on the insulating substrate and the working electrode; a process to form an opposite electrode on the insulating layer in order to measure an electric variation between the opposite electrode and said working electrode; a process to form a measuring chamber by removing part of the insulating layer in such a way that said target solution can be stored and the working electrode can be exposed; and a process to accumulate an identification layer holding a biosubstance on the working electrode exposed in the measuring chamber.

[0011]

[Action] In the invention according to claim 1, the identification layer located at the bottom of the measuring chamber is immersed in a target solution when the measuring chamber is filled with the target solution. The target substance in the solution reacts with a biosubstance held in the identification layer and generates oxygen or hydrogen peroxide. Because of the generation of oxygen or hydrogen peroxide, redox reaction occurs on the working electrode. As a result, current flows between the working electrode and the opposite electrode. Based on this current, the target substance in the solution is measured.

[0012] In the present invention, the identification layer is laminated on the working electrode located at the bottom of the measuring chamber. The identification layer can be formed in a fixed thickness with a wide area and little unevenness, because it is formed by accumulating in a partitioned space at the bottom of a measuring chamber. Since the unevenness of the thickness of the identification layer can be reduced, it is possible to form a working electrode and an opposite electrode at a small interval by inserting an insulating layer in between the working electrode and the opposite electrode, maintaining a fixed interval between them and avoiding contacting the identification layer with the opposite electrode. Thus, the interval between the working electrode and the opposite electrode can be reduced. As a result, we can shorten an electric line of the electric double formed between both electrodes. Accordingly, it is possible to converge the initial current within a short period, which leads to shortening a measuring time

of a target substance. Furthermore, in the present invention, the measuring chamber is filled with a target substance for measurement. Therefore, there is no possibility for the target solution to leak from the measuring chamber, and accurate measurement is possible with a small amount of the target solution.

[0013] In the present invention according to claim 2, the insulating substrate and the insulating layer are laminated, and the measuring chamber is formed by removing part of the insulating layer in such a way as to expose the working electrode. Hence, the constitution according to claim 1 can be accomplished by such simple processes.

[0014]

[Working Example] We explain below a working example of the present invention in order to further clarify the abovementioned constitution and action.

[0015] Figure 1 shows a top view of the sensitivity station of a biosensor. Figure 2 shows a sectional view of figure 1 along with the II-II line. The sensitivity station 1 of a biosensor comprises an insulating substrate 3, a working electrode 5 formed on the insulating substrate 3, an identification layer 7 holding said biosubstance and laminated on said working electrode 5, an insulating layer 11 with a window 9 formed on the insulating substrate 3, and an opposite electrode 15 with an aperture 13 formed on the insulating layer.

[0016] The space formed by the sidewall 9a of said window 9 and the top side of the identification 7 is a measuring chamber 21 used for storing a target solution that immerses said identification layer 7.

[0017] Said identification layer 7 is a layer of gel material holding a biosubstance that biochemically reacts with a target substance in a solution. The identification layer is, for example, a layer formed by drying and solidifying glucose oxidase solated with cellulose. Said working electrode 5 and opposite electrode 15 comprise sensing stations 5a and 15a placed on the lower and upper sides of the measuring chamber 21 respectively, terminals 5b and 15b for connection, and wiring sections 5c and 15c connecting the sensing stations 5a and 15a with the terminals 5b and 15b, respectively. The terminals 5b and 15b of said working electrode and opposite electrode, respectively, are connected with each electric measuring section (not shown in the figure). The current value between terminals 5b and 15b should be found at said electric measuring sections in order to measure the target substance.

[0018] Next, we explain a method of measurement using said biosensor. The sensitivity station 1 of the biosensor should be immersed in a target solution, and then a fixed voltage be applied between the working electrode and the opposite electrode. The target substance in a solution reacts with a biosubstance in the identification layer 7 biochemically. This reaction triggers the flow of current, based on which the measurement of the target substance is possible.

[0019] Next, we explain a process of producing said biosensor.

(1) A process of producing the insulating substrate 3 (figure 3 (A))

First, the insulating substrate 3 is made. A process of making the insulating substrate 3 may include a

method of cutting out a plate made of glass, resin, or their composite material or a method of calcinating ceramic greensheet.

[0020] (2) A process of forming the working electrode 5 (figure 3 (B))

The working electrode 5 is made on the insulating substrate 3. A process of making the working electrode 5 may include common knowledge in the art such as thick film printing, vapor deposition, and sputtering methods. Material for the working electrode 5 may include gold, platinum, silver, titanium, and their alloy.

[0021] (3) A process of forming the insulating layer 11 (figure 3 (C))

The insulating layer 11 is laminated on the insulating substrate 3 and the working electrode 5. A process of making the insulating layer 11 may include a method of forming plates made of insulating material and gluing them together, a method of forming layers by applying melted resin of a fixed thickness, and a method of laminating insulating material of a fixed thickness using a vapor deposition method. Material for the insulating layer 11 may include glass, ceramics, resin, and their composite material.

[0022] (4) A process of forming the opposite electrode 15 (figure 3 (D))

The opposite electrode 15 is made on the insulating layer 11. A process of making the opposite electrode 15 may include, as in the case of making the working electrode 5, thick film printing, vapor deposition, and sputtering methods. The shape of the aperture 13 of the opposite electrode 15 may include, in addition to a square as shown in figure 1, a circle, a polygon, a slit, and a lattice. Material for the opposite electrode 15 may include gold, platinum, palladium, copper, iron, silver, titanium, aluminum, zinc, nickel, tin, and their alloy.

[0023] (5) A process of forming the measuring chamber 21 (figure 3 (E))

The measuring chamber 21 is made by removing part of the insulating layer 11 in such a way as to expose the working electrode 15 through the aperture 13 of the opposite electrode 15. A process of making the measuring chamber 21 may include a method of etching a mask formed by a photoresisting method. A process of making the measuring chamber 21 may also include a method of forming the insulating layer 11 with a window 9 first and then laminate it on the insulating substrate 3 in such a way that said window 9 becomes the measuring chamber 21.

[0024]

It is desirable, as shown in figure 2, that the sidewall 9a of the measuring chamber 21 has a shape of extending toward the inner part from the aperture 13. In other words, it is desirable to etch the insulating layer 11 in such a way that the section around the aperture 13 of the opposite electrode 15 overhangs. An interval between the edge of the aperture 13 and the sidewall 9a should be as long as possible, as far as the opposite electrode 15 can be supported by the insulating layer 11 and the opposite electrode 15 can stay on the opposite side of the working electrode 5 through the measuring chamber 21. In this manner, the measuring chamber 21, in which the opposite electrode 15 and the working electrode 5 face with each other in parallel, becomes wide, and an electric line of the electric double formed by the opposite electrode 15 and the working electrode 5 becomes short and perpendicular to both surfaces of the opposite electrode 15 and the working electrode 5. As a result, time t_1 needed for converging the initial

[0025] (6) A process of forming the identification layer 7

After the measuring chamber 21 is formed, the identification layer 7 is made on the working electrode 5. The identification layer 7 is to hold a biosubstance that generates oxygen or hydrogen peroxide by biochemically reacting with a target substance. A process of having the identification layer 7 hold a biosubstance may use a method that is common knowledge in the art including a method of containing a biosubstance in a macromolecular matrix, a method of solidifying a biosubstance using a substance that makes a covalent bond with the biosubstance, and a method of adsorbing a biosubstance in an insoluble membrane. Since it is to be made at the bottom of the measuring chamber 21, the identification layer 7 can be formed by making a solated high polymer holding a biosubstance first and then adding this polymer to the sensing station 5a of the working electrode 5 dropwise. On top of a variety of enzymes, a biosubstance could be a microbe that makes it possible to measure a corresponding target substance.

[0026] In the abovementioned working example, the identification layer 7 is laminated on the working electrode 5 placed at the bottom of the measuring chamber 21. The identification layer 7 can be formed in a fixed thickness with a wide area and little unevenness, because it is formed by accumulating in a partitioned space at the bottom of the measuring chamber 21. Since the unevenness of the thickness of the identification layer 7 can be reduced, it is possible to form a working electrode 5 and an opposite electrode 15 at a small interval by inserting an insulating layer 11 in between the working electrode 5 and the opposite electrode 15, maintaining a fixed interval between them and avoiding contacting the identification layer 7 with the opposite electrode 15. Thus, the interval between the working electrode 5 and the opposite electrode 15 can be reduced, which leads to reducing electric resistance between both electrodes. Moreover, since the ratio of the interval between both electrodes to the area of the working electrode 5 becomes small, the equipotential surface is formed running parallel to the working electrode. As a result, we can shorten an electric line of the electric double formed between both electrodes. Accordingly, it is possible to converge the initial current within a short period, which leads to shortening a measuring time of a target substance.

[0027] Shortening of time needed for converging the initial current as explained above makes the initial current value small after a fixed period, and therefore the S/N ratio is improved for the current value resulted from actual reaction. Accordingly, accurate measurement becomes possible. Furthermore, in the present invention, the measuring chamber is filled with a target substance for measurement. Therefore, accurate measurement is possible with a small amount of the target solution.

[0028]

[Experimental Example] We applied the biosensor of the above-said working example to a glucose sensor to measure glucose. The sensitivity station 1 of the biosensor was made by the following steps. First, cut a glass plate manufactured by Corning Incorporated (trade name: 7059) into a size of 50mm in length x 50mm in width x 0.5mm in thickness as the insulating substrate 3. Next, make the working electrode 5 by forming a mask using a photoresisting method first and then vapor depositing 0.3 μ m in thickness of platinum on the unmasked part of the insulating substrate 3. The size of the sensing station 5a of the working electrode 5 was 2mm in length x 2mm in width. Form the insulating layer 11 by applying 3 μ m

in thickness of polyimide resin manufactured by TORAY (trade name: Photonis) to the insulating substrate 3. Make $0.5\ \mu\text{m}$ in thickness of the opposite electrode 15 on the insulating layer 11 using a vapor deposition method in such a way that the aperture 13 can be made. Form a mask on the opposite electrode 15 and the insulating layer 11 using a photoresisting method, followed by forming the measuring chamber 21 by etching part of the insulating layer 11 through the unmasked aperture 13 of the opposite electrode 15. Solate glucose oxidase by dissolving it in albumin. Finally, add this solated substance dropwise and dry it in order to make the identification layer 7.

[0029] We measured glucose by connecting the sensitivity station 1 of the biosensor produced by a series of the abovementioned processes to the electric measuring section. First, we prepared a sample solution by adding 50mg of glucose to a buffer solution (0.1M phosphate buffer) at 27°C . Next, we applied a fixed voltage (0.9V) between the working electrode 5 and the opposite electrode 15 of the sensitivity station 1 of the biosensor and then immersed the sensitivity station 1 in the sample solution.

[0030] It took 5 seconds, shorter than 30 seconds necessary for a traditional plate-type biosensor, before the initial current converged and its influence came to nothing. The time for measurement was 15 seconds, which was 15 seconds shorter than is necessary for a traditional biosensor.

[0031] The present invention is not limited to the abovementioned working example, but can possibly be used in a wide range of applications as far as they are within the scope of the present invention. To take just one example, the following variation is also possible.

[0032] If the aperture 13 of the opposite electrode 15 is small in the abovementioned working example, it may be difficult to fill a target solution in the measuring chamber 21. To solve this problem, such a hydrophilic polymer as polyvinyl acetate can be applied around the aperture 13. As a result, the wetting problem is improved and a target solution can surely be filled in the measuring chamber 21.

[0033]

[Effects of the Invention] In the present invention according to claim 1, as explained above, the identification layer can be formed in a fixed thickness with a wide area and little unevenness, because it is formed by accumulating in a partitioned space at the bottom of a measuring chamber. Since the unevenness of the thickness of the identification layer can be reduced, it is possible to form a working electrode and an opposite electrode at a small interval by inserting an insulating layer in between the working electrode and the opposite electrode, maintaining a fixed interval between them and avoiding contacting the identification layer with the opposite electrode. Thus, the interval between the working electrode and the opposite electrode can be reduced. As a result, we can shorten an electric line of the electric double formed between both electrodes. Accordingly, it is possible to converge the initial current within a short period, which leads to shortening a measuring time of a target substance.

[0034] In the present invention, the measuring chamber is filled with a target substance for measurement. Therefore, accurate measurement is possible with a small amount of the target solution.

[0035] Furthermore, in the present invention according to claim 2, the insulating substrate and the

Published Unexamined Patent Application No. H5-312761, Pages 1-6

insulating layer are laminated, and the measuring chamber is formed by removing part of the insulating layer in such a way as to expose the working electrode. Hence, the constitution according to claim 1 can be accomplished by the above-said simple processes.

[Brief Explanation of Drawings]

[Figure 1] A top view of the sensitivity station of a biosensor according to one working example of the present invention

[Figure 2] A sectional view of figure 1 along with the II-II line

[Figure 3] Drawings explaining the production process of the sensitivity station of a biosensor according to the above-said working example

[Figure 4] A single view drawing showing the sensitivity station of a traditional biosensor

[Figure 5] A graph to show the relationship between current values and time during the measurement using a biosensor

[Explanation of Reference Numerals]

- 1. Sensitivity Station
- 3. Insulating Substrate
- 5. Working Electrode
- 5a. Sensing Station
- 5b. Terminal
- 5c. Wiring Section
- 7. Identification Layer
- 9. Window
- 9a. Sidewall
- 11. Insulating Layer
- 13. Aperture
- 15. Opposite Electrode
- 21. Measuring chamber

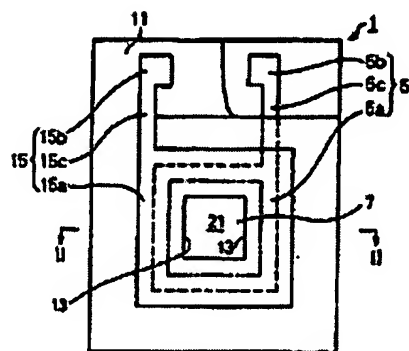


Figure 1

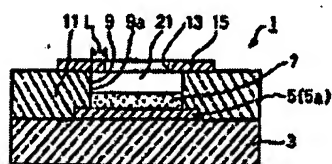


Figure 2

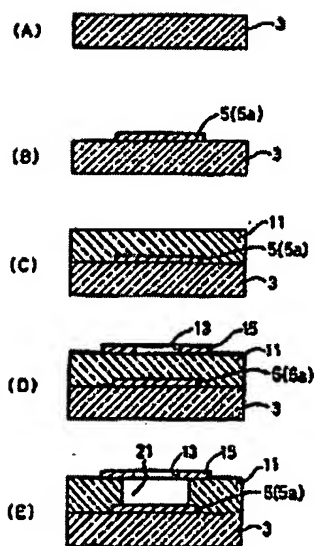


Figure 3

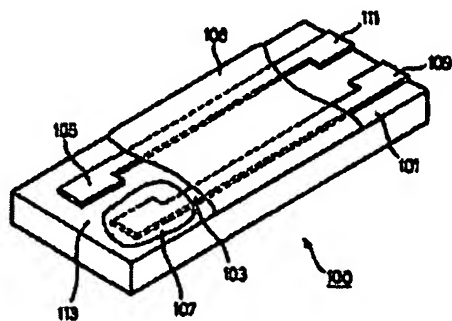


Figure 4

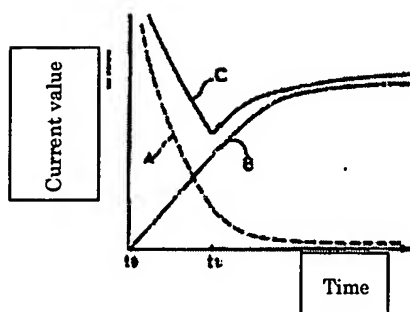


Figure 5

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-312761

(43)公開日 平成5年(1993)11月22日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	FI	技術表示箇所
G 0 1 N 27/327 27/28	3 3 1 Z	7235-2J 7235-2J 7235-2J	G 0 1 N 27/ 30	3 5 3 J 3 5 3 Z

審査請求 未請求 請求項の数2(全 6 頁)

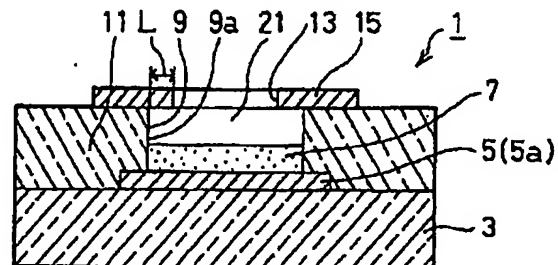
(21)出願番号	特願平4-146336	(71)出願人	000010087 東陶機器株式会社 福岡県北九州市小倉北区中島2丁目1番1号
(22)出願日	平成4年(1992)5月12日	(72)発明者	福田 幸弘 福岡県北九州市小倉北区中島2丁目1番1号 東陶機器株式会社内
		(72)発明者	坪井 宏之 福岡県北九州市小倉北区中島2丁目1番1号 東陶機器株式会社内
		(72)発明者	小黑 利雄 福岡県北九州市小倉北区中島2丁目1番1号 東陶機器株式会社内
		(74)代理人	弁理士 五十嵐 孝雄 (外1名)

(54)【発明の名称】 バイオセンサ及びその製造方法

(57)【要約】

【目的】 本発明は、被測定溶液中の被測定応答性を短時間で測定することができるバイオセンサ及びその製造方法を提供することを目的とする。

【構成】 生体物質を担持した識別層7は、測定室21の底部の区画されたスペースに堆積されるように形成されているので、ばらつきの少ない所定厚さで、かつ広い表面積で形成することができる。識別層7の厚さのばらつきを少なくできるので、作用極5と対極15と間に絶縁層11を介在させて所定距離確保しておけば、識別層7を対極15に接触させることなく、作用極5と対極15を狭い間隔で形成することができる。これにより、作用極5と対極15の間に形成される電気二重層間の電気力線を短くすることができる。その結果、測定の初期に流れるノイズ電流を短時間に収束させることができ、被測定物質の測定時間を短縮することができる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 被測定溶液中の被測定物質と生体物質との生物化学反応に伴う電気変化量を測定することにより被測定物質を測定するバイオセンサにおいて、絶縁性基板と、絶縁性基板上に積層された作用極と、上記生体物質を担持し、かつ上記作用極上に積層された識別層と、この識別層を除く上記絶縁性基板上に積層された絶縁層と、この絶縁層上に積層され、上記作用極との間における電気変化量を測定するための対極と、上記被測定溶液を貯留し、かつ貯留した被測定溶液を上記識別層及び対極に浸すように上記絶縁層の一部を除去形成した測定室とを備えたことを特徴とするバイオセンサ。

【請求項2】 被測定溶液中の被測定物質と生体物質との生物化学反応に伴う電気変化量を測定することにより被測定物質を測定するバイオセンサの製造方法において、

絶縁性基板を形成する工程と、絶縁性基板上に作用極を積層する工程と、絶縁基板及び作用極上に絶縁層を形成する工程と、絶縁層上に、上記作用極との間における電気変化量を測定するための対極を形成する工程と、上記被測定溶液を貯留し、かつ作用極を露出させるように絶縁層の一部を除去して測定室を形成する工程と、測定室内にて露出された作用極上に、生体物質を担持した識別層を堆積する工程と、を備えたことを特徴とするバイオセンサの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、被測定溶液中の被測定物質と生体物質との生物化学反応による電気変化量を測定することにより被測定物質を測定するバイオセンサ及びその製造方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 従来、この種のバイオセンサとして、例えば、特開昭61-50262号公報に示す平板型のバイオセンサが知られている。すなわち、図4に示すように、平板型のバイオセンサ100は、セラミックス基板101と、このセラミックス基板101上に形成された作用極103及び対極105と、上記作用極103と対極105との間を絶縁する絶縁層108と、上記作用極103上に、酵素などの生体物質を担持したゲル状物質を塗布形成した識別層107と、上記作用極103及び対極105の端子部109、111にそれぞれ接続され、その間の電流値を測定する電気測定部（図示省略）とを備えており、上記識別層107側が感応部113となっている。

【0003】 このバイオセンサ100を用いて被測定溶液を測定するには、感応部113を被測定溶液に浸漬させる。これにより、識別層107に担持した生体物質が被測定溶液に含まれている被測定物質と生物化学反応し、酸素または過酸化水素を発生する。この酸素等の発生による酸化還元に伴う電流を電気測定部で測定することにより、被測定物質が測定される。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 こうしたバイオセンサ100では、使用上、被測定溶液をできるだけ短時間で測定できることが要請されている。しかし、従来のバイオセンサ100では、以下の理由により短時間で測定が困難である。すなわち、上記バイオセンサ100で測定した際の電流値と時間との関係を図5に示す。図5において、破線は初期電流値Aを示し、1点鎖線は実測電流値Bを示し、実線は測定電流値Cを示す。

【0005】 ここで、初期電流値Aは、作用極103と対極105に、被測定物質を含まない緩衝液を浸したときの電流値である。この初期電流は、乾燥した状態の作用極103及び対極105に緩衝液を浸すと、作用極103と対極105との間に電気二重層が形成され、この電気二重層を解消するように流れる電流である。この初期電流が収束するまでに要する時間 t_1 は、作用極103と対極105との間隔に比例して大きくなる。また、実測電流値Bは、初期電流値Aが収束した状態から、緩衝液中に被測定物質を添加したときに、被測定物質と生体物質との生物化学反応に基づいて流れる電流値である。つまり、実測電流値Bは、生物化学反応だけに伴う電流値であり、反応が飽和すると、所定値に収束する。さらに、測定電流値Cは、緩衝液に被測定物質を溶解することにより調製した被測定溶液を用いて、この被測定溶液にバイオセンサの感応部113を浸漬したときの電流値であり、初期電流値Aと実測電流値Bの合計値である。

【0006】 ところで、例えば、尿中に含まれているグルコース等を上記バイオセンサ100で測定するには、上記測定電流値Cを用いる必要がある。この測定電流値Cは、初期電流値Aを含んでおり、その初期電流値Aが大きい間（時点 t_0 ～時点 t_1 ）は、測定不能であり、初期電流値Aが収束してからしか測定できない。こうした初期電流値Aが収束するまでの時間 t_1 は、作用極103と対極105において形成される電気二重層間の電気力線の長さを短くすることにより減少させることができる。この電気二重層間の電気力線の長さを短くするためには、作用極103と対極との間隔を短くすればよい。

【0007】 しかし、上記平板型のバイオセンサ100では、作用極103上に生体物質を担持したゾル状物質を塗布形成により識別層107を形成しているが、作用極103と対極105との距離を小さくすると、作用極

103だけに識別層107を形成することができず、対極105にまでゾル状物質が塗布されて測定不能となる。このため、作用極103と対極105との間隔は、20 μ mより短くすることができず、測定時間は、30秒以上を要している。

【0008】本発明は、上記従来の技術を解決することを課題とし、被測定溶液中の被測定応答性を短時間で測定することができるバイオセンサ及びその製造方法を提供することを目的とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】上記課題を解決するためになされた請求項1の発明は、被測定溶液中の被測定物質と生体物質との生物化学反応に伴う電気変化量を測定することにより被測定物質を測定するバイオセンサにおいて、絶縁性基板と、絶縁性基板上に積層された作用極と、上記生体物質を担持し、かつ上記作用極上に積層された識別層と、この識別層を除く上記絶縁性基板上に積層された絶縁層と、この絶縁層上に積層され、上記作用極との間における電気変化量を測定するための対極と、上記被測定溶液を貯留し、かつ貯留した被測定溶液を上記識別層及び対極に浸すように上記絶縁層の一部を除去形成した測定室とを備えたことを特徴とする。

【0010】また、請求項2の発明は、被測定溶液中の被測定物質と生体物質との生物化学反応に伴う電気変化量を測定することにより被測定物質を測定するバイオセンサの製造方法において、絶縁性基板を形成する工程と、絶縁性基板上に作用極を積層する工程と、絶縁基板及び作用極上に絶縁層を形成する工程と、絶縁層上に、上記作用極との間における電気変化量を測定するための対極を形成する工程と、上記被測定溶液を貯留し、かつ作用極を露出させるように絶縁層の一部を除去して測定室を形成する工程と、測定室内にて露出された作用極上に、生体物質を担持した識別層を堆積する工程と、を備えたことを特徴とする。

【0011】

【作用】請求項1の発明では、測定室に被測定溶液を滴たすと、測定室の底部の識別層が被測定溶液に浸される。被測定溶液中の被測定物質は、識別層に担持された生体物質と反応して、酸素または過酸化水素等を発生する。酸素等の発生により作用極上で酸化還元反応が生じて、作用極と対極との間に電流が流れる。この電流に基づいて被測定溶液中の被測定物質が測定される。

【0012】また、本発明では、測定室の底部に設けられた作用極上に識別層が積層されている。この識別層は、測定室の底部の区画されたスペースに堆積されるように形成されているので、変動の少ない所定厚さで、かつ広い表面積で形成することができる。このように識別層の厚さの変動を少なくできるので、作用極と対極と間に絶縁層を介在させて所定距離確保しておけば、識別層を対極に接触させることなく、作用極と対極とを狭い間

隔で形成することができる。したがって、作用極と対極との距離を短くできるから、両極において形成される電気二重層間の電気力線の長さを短くすることができる。その結果、初期電流を短時間に収束させることができ、被測定物質の測定時間を短縮することができる。さらに、本発明では、測定室内に被測定溶液を滴たして測定しているので、測定室内から被測定溶液が流出することがなく、少ない被測定溶液の量で正確に測定することができる。

10 【0013】また、請求項2の本発明によれば、絶縁性基板及び絶縁層を積層し、作用極を露出させるように絶縁層の一部を削除することにより測定室を形成しており、こうした簡単な工程にて好適に請求項1の構成を実現することができる。

【0014】

【実施例】以上説明した本発明の構成・作用を一層明らかにするために、以下本発明の好適な実施例について説明する。

20 【0015】図1はバイオセンサの感応部の平面図を示し、図2は図1のI-I'線に沿った断面図である。バイオセンサの感応部1は、絶縁性基板3と、上記絶縁性基板3上に形成された作用極5と、上記生体物質を担持し、上記作用極5上に積層された識別層7と、絶縁性基板3上に形成され、かつ窓部9を有する絶縁層11と、絶縁層11に形成され、開口13を有する対極15とを備えている。

【0016】上記窓部9の側壁9a及び識別層7の上面にて形成されるスペースは、被測定溶液を貯留して上記識別層7に浸すための測定室21となっている。

30 【0017】上記識別層7は、被測定溶液中の被測定物質と生物化学反応する生体物質をゲル状物質で担持して形成した層であり、例えば、グルコースオキシターゼをセルロースでゾル化した物質を乾燥固化した層である。また、上記作用極5及び対極15は、測定室21の上下方向にて設置した検出部5a、15aと、結線用の端子部5b、15bと、検出部5a、15aと端子部5b、15bとをそれぞれ接続する配線部5c、15cとから形成されている。上記作用極5及び上記対極15の端子部5b、15bには、電気測定部（図示省略）がそれぞれ接続されており、この電気測定部にて端子部5b、15bの間に流れる電流値を求めて被測定物質の測定結果を求める。

【0018】次に上記バイオセンサを用いた測定法を説明する。バイオセンサの感応部1を被測定溶液中に浸漬し、この状態で作用極5と対極15との間に一定電圧を印加する。被測定溶液中の被測定物質は、識別層7の生体物質の作用により生物化学反応を行なう。この反応に伴って電流が流れ、この電流に基づいて被測定物質を測定することができる。

50 【0019】次に上記バイオセンサの製造工程について

説明する。

(1) 絶縁性基板3の製造工程(図3(A))

まず、絶縁性基板3を形成する。この絶縁性基板3の形成工程として、ガラスや樹脂またはそれらの複合材料からなる板材を切り出すか、あるいはセラミックスのグリーンシートを焼成する方法を採用することができる。

【0020】(2) 作用極5の形成工程(図3(B))

絶縁性基板3上に作用極5を形成する。作用極5の形成工程として、周知の厚膜印刷法、蒸着法、スパッタリング法等を採用することができる。作用極5の材料としては、金、白金、パラジウム、銀、チタン等及びそれらの合金を用いることができる。

【0021】(3) 絶縁層11の形成工程(図3(C))

絶縁性基板3及び作用極5上に絶縁層11を積層する。絶縁層11の形成工程として、絶縁材料からなる板材を形成し、これを接着することにより形成する方法、溶融樹脂を所定厚さだけ塗布して層を形成する方法、蒸着法にて絶縁材料を所定厚さ堆積させて形成する方法等を採用することができる。絶縁層11の材料としては、例えばガラス、セラミックスまたは樹脂、あるいはこれらの複合材料を用いることができる。

【0022】(4) 対極15の形成工程(図3(D))

絶縁層11上に対極15を形成する。対極15の形成工程として、作用極5と同様な方法、つまり、厚膜印刷法、スパッタリング、蒸着法等を採用することができる。対極15の開口13は、図1のように正方形のほか、円形、多角形、スリット状、または格子状に形成してもよい。対極15の材料としては、金、白金、パラジウム、銅、鉄、銀、チタン、アルミニウム、亜鉛、ニッケル、スズ、及びそれらの合金を用いることができる。

【0023】(5) 測定室21の形成工程(図3(E))

対極15の開口13を通じて、作用極5を露出させるように絶縁層11の一部を除去することにより測定室21を形成する。測定室21の形成工程として、例えば、フォトリソ法によりマスクを形成し、エッチング等により形成する方法を採用することができる。なお、測定室21の形成工程として、窓部9を有する絶縁層11を形成し、これを絶縁性基板3に積層することにより、上記窓部9が測定室21となる方法を採用してもよい。

【0024】また、図2に示すように、測定室21の側壁9aは、開口部13より奥側へ向かって広がる形状、つまり、対極15の開口部13の周縁部がオーバーハングするように絶縁層11をエッチングすることが望ましい。この場合において、開口部13の周縁部から側壁9aまでの距離Lは、絶縁層11によって対極15を支持でき、かつ対極15が測定室21を介して作用極5と対

向できる範囲内であればできるだけ長いほうがよい。これは、対極15と作用極5とが平行に対向する測定室21の領域が広くなり、しかも、対極15と作用極5において形成される電気二重層間の電気力線が対極15及び作用極5各々の面に垂直で、かつ短く形成することができ、よって、初期電流値Aが収束するまでの時間t1(図5参照)を短くすることができるからである。

【0025】(6) 識別層7の形成工程

測定室21を形成した後に、作用極5上に識別層7を形成する。識別層7には、被測定物質と生物化学反応して、酵素または過酸化水素等を発生する生体物質を担持させる。識別層7に生体物質を担持させる工程として、周知の方法を適用することができ、例えば、生体物質を高分子マトリックス中に包括させる包括法、生物物質と共有結合する物質を用いて固定化する共有結合法、不溶性の膜に生体物質を吸着させる吸着法等を採用することができる。ここでは、識別層7は、測定室21の底に形成されるので、生体物質を担持したゾル状高分子体を形成し、このゾル状高分子体を作用極5の検出部5aに滴下することにより好適に形成できる。生体物質としては、各種の酵素のほか、微生物等を用いることができ、これに対応した被測定物質を測定することができる。

【0026】上記実施例において、測定室21の底部に設けられた作用極5上に識別層7が積層されている。この識別層7は、測定室21の底部の区画されたスペースに堆積されるように形成されているので、変動の少ない所定厚さで、かつ広い表面積で形成することができる。このように識別層7の厚さの変動を少なくできるので、作用極5と対極15と間に絶縁層11を介在させて所定距離確保しておけば、識別層7を対極15に接触させることなく、作用極5と対極15を狭い間隔で形成することができる。したがって、作用極5と対極15との距離を狭くすることができるから、両極間の電気抵抗を小さくすることができ、しかも、作用極5の面積に対する両極間の距離の比が小さくすることができるから、等電位面が作用極に平行に形成され、両極間に形成される電気二重層間の電気力線を短くすることができる。その結果、初期電流を短時間に収束させることができ、被測定物質の測定時間を短縮することができる。

【0027】また、上述したように初期電流が収束するまでの時間が短くなると、一定時間後の初期電流値が小さくなり、実際の反応に伴う電流値に対するS/N比が向上するので、正確な測定ができるという効果もある。さらに、実施例では、測定室21内に被測定溶液を満たして測定しているので、測定室21内に満たされた少ない被測定溶液だけで正確に測定することができる。

【0028】<実験例>次に、上記実施例にかかるバイオセンサをグルコースを測定するグルコースセンサに適用し、その評価試験を行なった。バイオセンサの感応部

1は、以下の工程により作成した。まず、絶縁性基板3としてガラス板（コーニング社製：商品名7059）を、縦50mm×横50mm×厚さ0.5mmの大きさに加工した。次に、フォトリソトによりマスクを形成し、マスクがされていない絶縁性基板3上に蒸着法を用いてPtを厚さ0.3μmに蒸着させて作用極5を形成した。作用極5の検出部5aの大きさは、縦2mm×横2mmである。次に、ポリイミド樹脂（東レ社製：商品名フォートニス）を絶縁性基板3上に厚さ3μmに塗布することにより絶縁層11を形成した。続いて、蒸着法により絶縁層11上に開口13を有するように対極15を厚さ0.5μmに形成した。その後、対極15及び絶縁層11上にフォトリソト法によりマスクを形成し、マスクがされていない対極15の開口13を通じて絶縁層11の一部をエッチングして測定室21を形成した。次に、グルコースオキシターゼをアルブミンに溶かしてゾル化し、このゾル化した物質を滴下して乾燥させることにより、識別層7を形成した。

【0029】この一連の工程により作成したバイオセンサの感応部1を電気測定部に接続してグルコースを測定した。すなわち、緩衝液（0.1Mリン酸バッファ、27℃）中にグルコース50mg添加して試料溶液を調製した。バイオセンサの感応部1の作用極5と対極15との間に一定電圧0.9Vを印加した。この状態にて感応部1を試料溶液に浸漬した。

【0030】その結果、初期電流が収束して、その影響がなくなるまでの時間が5秒であり、従来の平板型バイオセンサの30秒と比べて短時間であった。したがって、測定時間は、15秒であり、従来と比べて15秒間短縮することができた。

【0031】なお、この発明は上記実施例に限られるものではなく、その要旨を逸脱しない範囲において種々の態様において実施することが可能であり、例えば次のような変形も可能である。

【0032】上記実施例において、対極15の開口13が狭い場合には、被測定溶液が測定室21内に満たされ難い場合がある。これを解決する手段として、開口13の周辺部に親水性ポリマー（例えば、ポリ酢酸ビニル）を装着する。これにより、濡れ性が改善されて、被測定溶液を測定室21内に確実に満たすことができる。

【0033】

【発明の効果】以上説明したように請求項1の本発明によれば、測定室の底部の区画されたスペースに堆積され

るように識別層を形成しているため、変動の少ない所定厚さにかつ広い表面積で形成することができる。このように識別層の厚さの変動を少なくできるので、作用極と対極と間に絶縁層を介在させて所定距離確保しておけば、識別層を対極に接触させることなく、作用極と対極を狭い間隔で形成することができる。したがって、作用極と対極との距離を狭くすることができるから、両極間に形成される電気二重層間の電気力線を短くすることができる。その結果、初期電流を短時間に収束させることができ、被測定物質の測定時間を短縮することができる。

【0034】また、本発明では、測定室内に被測定溶液を滴下して測定しているため、測定室内に満たされた少ない被測定溶液だけで正確に測定することができる。

【0035】さらに、請求項2の本発明によれば、絶縁性基板及び絶縁層を積層し、作用極を露出させるように絶縁層の一部を削除することにより測定室を形成しており、こうした簡単な工程にて好適に請求項1の構成を実現することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の一実施例にかかるバイオセンサの感応部を示す平面図。

【図2】図1のII-II線に沿った断面図。

【図3】同実施例にかかるバイオセンサの感応部の製造工程を説明する説明図。

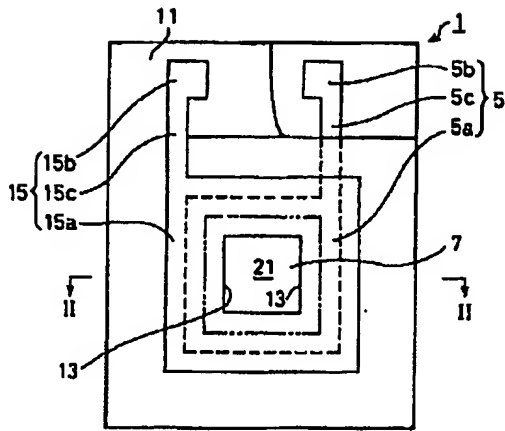
【図4】従来のバイオセンサの感応部を示す斜視図。

【図5】バイオセンサの測定時に流れる電流値と時間との関係を示すグラフ。

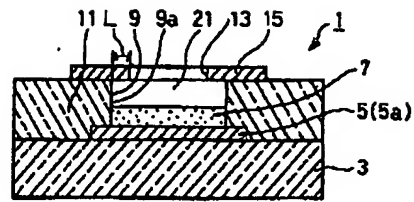
【符号の説明】

- 30 1…感応部
- 3…絶縁性基板
- 5…作用極
- 5a…検出部
- 5b…端子部
- 5c…配線部
- 7…識別層
- 9…窓部
- 9a…側壁
- 11…絶縁層
- 40 13…開口
- 15…対極
- 21…測定室

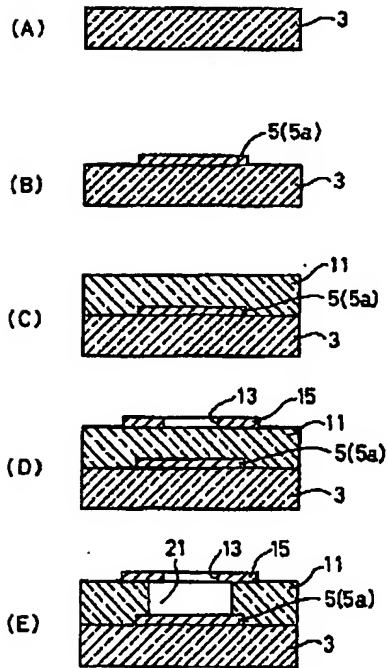
【図1】



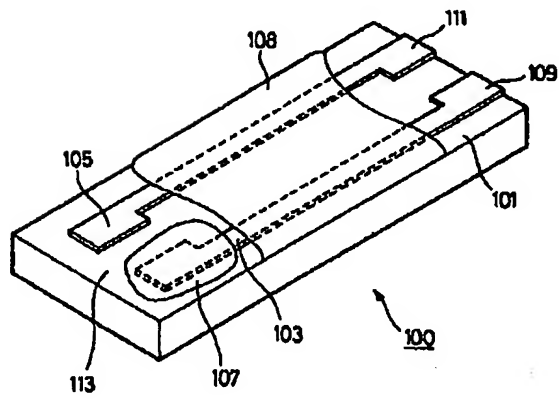
【図2】



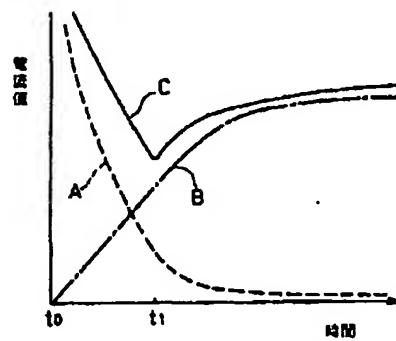
【図3】



【図4】



【図5】



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.